

〈Original article〉

## 미꾸라지 (*Misgurnus mizolepis*)에서 분리된 수생균 (*Saprolegnia parasitica*)에 대한 천연유황수의 항균 활성 및 처리에 대한 어류 안전성

이승원 · 이승협 · 이상종 · 김미희 · 이해현 · 추셋별 · 김경희 · 이희정\*

농업회사법인 주식회사 엘바이오텍 기업부설연구소

## Fish Safety and Antimicrobial Activity of Natural Sulfur Solution on Aquatic Microorganisms (*Saprolegnia parasitica*) Isolated from *Misgurnus mizolepis*

Seung-Won Yi, Seung-Hyeop Lee, Sang-Jong Lee, Mi-Hee Kim, Hye-Hyun Lee, Saet-Byul Chu, Kyung-Hee Kim and Hee Jung Lee\*

Research Institute of Agriculture Corporation LbioTech, 849 Chuseong Iro, Damyang-gun, Jeollanam-do 57316, Korea

**Abstract** - Basic dyes such as malachite green and methylene blue have been used as disinfectants to control water fungal infections since the 1930s. However, after succeeding reports of carcinogenicity and bioaccumulation of the dye, their use was forbidden in lieu of public health. This study undertook to evaluate the therapeutic effect of sulfur solution processed by effective microorganisms (EM-PSS) against *Saprolegnia parasitica* infection, and its safety in fish. *In vitro* antifungal evaluation of EM-PSS inhibited the growth of *S. parasitica* mycelia at concentrations of 50 ppm or higher. The acute toxicity test of EM-PSS to the mud fish (*Misgurnus mizolepis*) measured a no effect concentration (NOEC) at 100 ppm, the lowest effect concentration (LOEC) at 125 ppm, and the half-lethal concentration (LC<sub>50</sub>) at 125 ppm in juvenile and 250 ppm in the immature stage. In addition, the ecotoxicity test of EM-PSS using *Daphnia magna* inhibited swimming of *D. magna* at concentrations of 100 ppm or less. Lastly, the EM-PSS prevented infection of *S. parasitica* to mud fish, at concentrations of 50 ppm. Furthermore, at 100 ppm concentration, the EM-PSS showed no acute toxicity on mud fish, nor any eco-toxic effects on *D. magnano*. Therefore, we conclude that carcinogenic disinfectants such as malachite green and methylene blue could be replaced by EM-PSS to remove *S. parasitica* in mud fish farming, and might be a potential eco-friendly disinfectant in aquaculture.

**Key words** : antifungal activity, safety, *Saprolegnia parasitica*, sulfur solution, mud fish

\* Corresponding author: Hee Jung Lee, Tel. 061-381-0383,  
Fax. 061-382-0383, E-mail. [hjlee-hin@hanmail.net](mailto:hjlee-hin@hanmail.net)

## 서 론

미꾸라지(*Misgurnus mizolepis*)는 가늘고 긴 체형과 장호흡으로 인해 연못, 논두렁, 수로 등 수심이 얇고 수위 변화가 빈번한 담수환경에 서식하기 적합하다(Nam 2007; Kim *et al.* 2011). 갑각류, 연충류, 곤충류, 동물성 및 식물성 플랑크톤, 클로렐라 등 살아 있는 생물을 먹이로 하며, 맑은 곳보다는 어두운 곳을 좋아하며 먹이를 찾을 때 외에는 몸은 흙 속에 묻고 주둥이와 눈만을 밖으로 내어 아가미 호흡을 한다. 그러나 산소가 부족한 환경에서는 장호흡을 하여 창자의 벽으로 산소를 흡수하고 남은 공기는 항문을 통하여 내놓는다. 미꾸라지는 1980년까지도 우리나라 전역의 늪과 농수로 등에서 관찰할 수 있었으나 경지정리, 농업 환경 변화, 화학비료 및 농약 사용 등으로 인한 수질 변화 등으로 인해 그 수가 감소하고 있다(Kim and Lee 1985; Han *et al.* 2013).

미꾸라지는 맛이 우수할 뿐 아니라 단백질, 비타민 A, 비타민 D가 풍부해 예로부터 우리나라를 포함한 동북아시아에서 애용되어온 강장식품으로, 최근에는 국민소득 수준 향상 등으로 삶의 질과 건강에 대한 관심이 크게 증가하면서 식량으로서의 미꾸라지에 대한 수요가 급격한 증가 추세에 있다. 부족한 수요를 충족시키기 위한 대책으로 중국산 미꾸라지 종묘의 수입과 미꾸라지의 고밀도 사육이 성행하고 있으나 이로 인해 발생하는 사육 환경의 악화, 개체 간의 잦은 접촉, 스트레스, 질병의 빠른 발생과 전파 등의 문제는 미꾸라지 양식 산업에 큰 경제적 손실을 유발하고 있다(Park *et al.* 2012).

어류의 물곰팡이병의 원인체는 주로 편모균아문(Mastigomycotina)의 난균강(Oomycetes), 수생균목(Saprolegniales), 수생균과(Saplolegniaceae)에 속하는 균류로, 그중에서도 *Saprolegnia parasitica*가 담수어와 어란에 주로 기생하여 감염한다(Diéguez-Urbeondo *et al.* 1994; Jee *et al.* 2001). 수생균은 주로 20°C 이하인 저수온기에 발생하며, 어체의 물리적인 또는 외부 기생충 감염으로 인해 형성된 상처 부위에 착생하여 감염한다. 감염 부위에는 솜털 모양의 균사체를 형성하여 육안으로도 쉽게 판별이 가능하고, 균사체의 증식이 심한 경우에는 어체 전체에 광범위하게 퍼져 괴사를 일으켜 감염 개체를 폐사시킨다(Meyer 1991). 미꾸라지를 포함한 양식어류에서 수생균은 활어 수송, 선별, 채란, 채정 등의 작업에 생기는 상처 부위, 체표 기생충의 기생 부위, 병원체 및 영양성 질병에 의한 염증부위 등 1차적으로 형성된 체표 이상 부위에 2차적으로 감염되는데, 주로 상피 조직에 침입하여 균사체를 증식하여 생존 어류의 경제적 가치를 떨어뜨리거나 심한 경우에는 내장 또는 아가미까지 감염하여 어류를 폐사시킨다. 이를 예방하기 위해서는 항생제

와 화학약물의 사용이 불가피한 실정이다.

말라카이트 그린은 트리페닐메탄계 염료로 담수어류의 수생균 및 어류의 외부 기생충 치료에 탁월한 효과가 있고 가격이 저렴하여 1930년대부터 전 세계의 양식업에서 사용되어왔다(Alderman 1985; Rushing *et al.* 1997; Bergwerff and Scherpenisse 2003; Hashimoto *et al.* 2011). 그러나 1980년대 초반부터 발암성과 변이원성, 어체 내 축적, 그리고 어류를 섭취한 인체 내 축적 등의 공중보건학상 문제점들이 보고되면서 식용 어류의 양식에는 사용이 금지되었다(Srivastava *et al.* 2004; Myung and Kang 2005; Hashimoto *et al.* 2011). 그러나 현재도 말라카이트 그린만큼 뛰어난 항균력과 가격 경쟁력을 가진 구충제와 항균제는 거의 없는 실정이다(Myung and Kang 2005; Olesen *et al.* 2007; Pourreza *et al.* 2007; Hashimoto *et al.* 2011; Conti *et al.* 2015). 따라서 친환경 소재의 말라카이트 그린의 대체제 개발은 양식어민의 경제적 부담과 공중보건학상 문제 해결을 위해 시급한 과제이다.

유황은 살충력이 강하여 옴, 습진, 가려움증 등 피부병 치료에 효과가 있고 병원성 미생물의 생육을 억제하는 것으로 보고되어 왔다(Kumar and Berwal 1998; Kim *et al.* 2001; Seo *et al.* 2004). 또한 마늘과 양파 추출물에 있는 함유유기화합물은 현대적인 항생제가 나오기 전, 티푸스, 콜레라, 이질과 같은 질병의 치료약으로 널리 사용되어 왔다(Block 1986; Block 1992). 이런 여러 가지 효능이 알려져 있음에도 불구하고 유황은 독성이 강하여 부작용을 초래하기 때문에 유황을 약으로 사용하기 위해서는 법적 과정을 거쳐야 하고 사용 전, 그 안전성이 평가되어야 한다(Choi and Kim 2002; Song *et al.* 2007). 최근에는 법적 유황이 항생제를 대체하여 친환경 농산, 축산 및 수산물의 개발에 이용되고 있으며, 또한 의약품 및 기능성 건강식품에도 독성을 제거한 법적유황이 활용되고 있다(Jung *et al.* 2000; Youm *et al.* 2000; Kim 2002; Lee *et al.* 2005). 본 연구에서는 수산 분야에서 법적유황의 어류 병원체에 대한 효력, 의약품으로서의 사용 가능성, 그리고 미꾸라지에 대한 안전성에 대해서 평가하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 천연유황수의 제조

천연유황은 인도네시아 이스트 자바섬의 카와이젠 화산에서 채취된 것을 구매하여 분쇄하였다. 12종의 유용 미생물(Raphael®; Lbiotech, Korea)은 보이차 잎, 녹차 잎, 광나무 잎을 발효시키는 과정에서 분리하였고 다음과 같다; *Lactobacillus parafarraginis*, *L. paracasei* subsp. *tolerans*, *L. harbinensis*, *L. buchneri*, *L. perolens*, *L. rhamnosus*, *L.*

*vaccinostercus*, *Acetobacter lovaniensis*, *A. peroxydans*, *Pichia fermentans*, *Candida ethanolica*, *Saccharomycopsis schoenii*. 천연유황 분말과 12종 미생물 배양액을 골고루 혼합한 뒤 30°C, 습도 35%에서 96시간 발효 법제를 2회 반복 수행하였다. 실험실 조건에서 다양한 비율과 조합으로 용해도를 측정 후 확립한 조건을 이용해, 법제된 천연유황 분말, NaOH, 그리고 물을 20 : 22 : 58 비율로 혼합하여 천연유황수 (effective-microorganisms-processed sulfur solution, EM-PSS)를 제조하였다.

## 2. 어류 병원체의 분리와 배양

2015년 가을, 전남 장성에 위치한 미꾸라지 양식장에서 육안적으로 수생균에 대한 감염증을 나타내는 미꾸라지 개체를 임의 수집하였다. 병어 5마리를 200 mL 멸균식염수가 포함된 1 L 삼각플라스크에 넣은 후 1시간 동안 침지 반응 시키어 수생균이 멸균식염수로 분리되어 나오도록 하였다. 수생균이 포함된 멸균식염수를 취하여 고체 배지에 도말한 후 배양하였다. 수생균의 분리에는 sabouraud dextrose agar (SDA, Difco) 및 potato dextrose agar (PDA, Difco)를 사용하였으며, 이후의 배양과 실험에서는 potato dextrose broth (PDB, Difco)와 PDA를 사용하였다. 순수분리된 수생균은 complete rDNA (18S, ITS1, 5.8S, ITS2, and 28S) 시퀀싱 후 NCBI BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>, USA) 검색을 통해 동정한 뒤 사용하였다.

## 3. 수생균에 대한 천연유황수의 최소억제농도 시험

법제된 천연유황 22.6%를 함유하는 천연유황수 (Lee *et al.* 2013)를 사용하였다. 유용 미생물을 이용해 법제한 천연유황수의 수생균에 대한 억제능 평가는 한천배지 희석법 (agar dilution)과 액체배지 희석법 (broth dilution)으로 수행되었다. 한천배지 희석법의 경우, 천연유황수 10, 30, 60, 100, 300, 600 그리고 1000 ppm을 포함한 PDA배지를 제조한 뒤, 5일간 25°C에서 배양한 *S. parasitica* 균사의 선단 부분을 일정량 채집하여 각 농도의 유황수를 포함하는 PDA 배지의 한 가운데에 도말하여 5일간 배양하였다. 액체배지 희석법의 경우, 기존 수생균 처리제와의 성장 억제능력 비교를 위해 PDA에 성장한 균사의 선단 부분 일정량을 채집 후 천연유황수, 과산화수소, 그리고 포르말린 10, 30, 그리고 50 ppm을 첨가한 PDB 배지에 각각 접종하여 육안으로 균사체의 성장을 비교하였다.

## 4. 어병 세균에 대한 천연유황수의 최소억제농도 시험

본 시험은 천연유황수 0, 25, 50, 그리고 100 ppm을 첨가

한 Mueller-Hinton agar에 멸균 식염수를 이용해 희석한 0.5 McFarland 탁도의 세균액을 접종하여 한천배지 희석법으로 수행하였다. 본 시험에 사용된 분리주는 2016년 봄과 여름에 전북지역 미꾸라지 양식장의 폐사 시료에서 분리한 *Vibrio* sp., *Aeromonas hydrophila*, 전북 지역의 한 호수에서 집단 폐사한 붕어에서 분리한 *Yersinia ruckeri*, 그리고 연쇄구균증이 발생한 넙치에서 분리된 *Streptococcus parauberis* 등 총 4종이었다.

## 5. 어류 사육 관리

본 연구에 사용된 미꾸라지 미성어 (10 g 전후)와 치어 ( $3.13 \pm 1.51$  g)는 전남 장성에 위치한 양식장에서 각각 2015년 가을과 2016년 여름에 구매하여 사용하였다. 사육수는 수돗물을 어류 입식 7일 전부터 순환 여과시켜 탈염하여 1차 모래 여과, 2차 생물학적 여과, 그리고 3차 자외선 살균 처리하여 사용하였다. 미꾸라지의 사육은 산소 발생장치가 장착된 가로 47×세로 29×높이 40 cm의 사각유리수조에서 15일간 이루어졌으며 사육온도는  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 로 유지하였다.

## 6. 천연유황수에 대한 미꾸라지의 안전성

천연유황수가 미꾸라지 어체에 미치는 급성 독성을 조사하기 위해 미성어와 치어를 대상으로 0, 25, 50, 75, 100, 125 그리고 250 ppm이 되도록 천연유황수를 첨가하였다. 각 수조에 미성어 15마리, 치어 20마리씩 넣고 5일간 급성 독성을 관찰하였다. 시험에 사용된 미성어는 시험 종료 후 3마리를 임의 선택하여 아가미, 간, 비장을 수집하였다. 장기는 일주일간 10% 중성 포르말린에 고정 후 hematoxylin and eosin (HE) 염색 후 검경하여 병리조직학적 분석을 수행하였다.

## 7. 물벼룩을 통한 생태 영향 예측

천연유황수의 첨가로 인한 수질의 변화는 시험 수행 기간 5일과 시험 종료 후 5일간 매일 아침 10~11시 사이에 유황수 농도별로 수조의 수온, 용존산소량 (DO), 그리고 pH를 측정하였다. 또, 천연유황수의 생태 독성 평가는 한국화학융합시험연구원 (KTR, Korea)에 의뢰하여 국립환경과학원 고시 제2015-8호와 OECD TG 202의 가이드라인에 따라 수행하였다. 시험 방법을 간략히 서술하면, 3주령의 어미 개체에서 생산된 생후 24시간 미만의 *Daphnia magna* neonate를 사용하였다. 배지는 OECD TG 202 방법에 따라 조제된 M4 배지를 135 mL 용량의 원통형 유리수조 (65 mm H×57 mm φ)에 100 mL 처리하여 사용하였고, 시험 수조당 물벼룩 5마리씩 사용하여 총 2회의 예비 시험과 4회의 본 시험을 반복하였다. 광주기는 시험 기간 동안 16시간 광 조건과 8시간의 암

**Table 1.** Growth inhibition of *Saprolegnia parasitica* and pathogenic bacteria under different concentrations of sulfur solution processed by effective microorganisms (EM-PSS) PDA plate. The spread of fungal hypha was not observed over 60 ppm concentrations of EM-PSS.

Pathogen	Source	Concentration of EM-PSS (ppm)							
		0	10	30	60	100	300	600	1000
Fungi									
<i>S. parasitica</i>	Mudfish	+	+	+	-**	-	-	-	-
Bacteria									
		0	3.06	6.13	12.5	25	50	75	100
<i>S. parauberis</i>	Olive Flounder	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>A. hydrophila</i>	Mudfish	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Vibrio</i> sp.	Mudfish	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Y. ruckerii</i>	Carp	+	+	+	+	+	+	+	+

\*; + indicates the mycelial growth of *S. parasitica*, \*\*; - indicates no mycelial growth of *S. parasitica*

조건으로 유지하였으며 사육 수온은  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ 를 유지하였다. 모든 시험수조에 대하여 실험시작 후 24 및 48시간 경과 시에 유영저해 및 이상증상 관찰을 실시하였고 유영저해의 판정은 시험용액을 가볍게 저어준 다음, 약 15초간 관찰하여 물의 흐름을 벗어나지 못하거나 유영하지 못하는 개체는 유황수의 독성 영향을 받은 것으로 간주하였다. 치사개체는 유영저해 개체에 포함시켰다.

## 결과 및 고찰

수생균 감염으로 인한 미꾸라지 양식 현장의 경제적 피해는 늘어나고 있지만, 국내에서 수생균에 대한 연구나 보고는 거의 없는 편이며, 그 마저도 뱀장어와 연어과 어류에 대한 것이다 (Min *et al.* 1990; Jee *et al.* 2013; Kim *et al.* 2013). 본 연구에서는 법제 유황수가 수생균과 병원성 세균에 대한 성장을 억제하는 농도를 찾고, 천연유황수의 미꾸라지 어체에 대한 안전성 및 담수생태계 등에 미칠 수 있는 영향을 고려한 생태영향 평가 등을 수행하였다.

### 1. 수생균과 병원성 세균에 대한 천연유황수의 성장 억제 효과

PDA plate에 배양한 *S. parasitica*를 각 농도의 천연유황수가 첨가된 PDA 배지에 도말하여 5일간 배양한 결과, 60 ppm 이상의 농도에서는 균사체의 성장이 억제되었다 (Table 1). 임상 검체에서 분리된 어병 세균 4종에 대한 성장 억제를 조사한 결과, *S. parauberis*는 24시간째 25 ppm에서, 48 시간째에는 50 ppm에서 성장이 억제되었으나, 나머지 3종의 세균 *Vibrio* sp., *A. hydrophila* 그리고 *Y. ruckerii*는 천연유황

수 100 ppm 이하에서 성장이 억제되지 않았다.

PDB 액체배지에서는 천연유황수 50 ppm 이상에서 수생균 균사체의 성장이 억제되었고 그람 음성 세균인 *S. parauberis*에서 대해서도 동일 농도에서 성장이 억제되었다 (data not shown). 법제 방법은 다르지만 Ha *et al.* (2009)도 제독 유황수를 사용해 사람의 피부 질환 곰팡이와 그람 양성 세균에 대해 항균활성을 관찰하였고 이는 본 연구의 결과와 비슷하였다. 그러나 천연유황수는 그람 음성 세균인 *A. hydrophila*, *Y. ruckerii*, *Vibrio* sp.의 경우 유황수 100 ppm에서 억제 효과가 없었다. Lee and Lee (2014)는 다량의 유황을 함유한 삼채 뿌리 추출물의 억제력을 곰팡이 및 그람 음성 세균, 그리고 그람 양성 세균을 포함하는 미생물 7종에 대해 시험한 결과, 시험에 사용한 추출물이 그람 양성 세균과 곰팡이의 성장을 억제시켰으나 그람 음성 세균에 대해서는 억제력이 없었다고 보고하여 본 연구의 결과와 비슷하였다. 이는 상대적으로 다당체가 많은 곰팡이와 그람 양성 세균의 세포벽 구조의 공통성에 의한 것으로 생각되지만 정확한 기전에 대해서는 추가적인 연구가 필요하다. 또한 본 연구의 항진균 효과에 대한 시험 결과는 *in vitro* 소독 효과를 측정 한 것으로서, 실제 양식현장에 바로 적용하기에는 무리가 있다. 따라서 *in vivo* 효력 시험과 현장 적용 시험을 추가 수행할 필요가 있으며, 이를 통해 실제 적용시의 효과를 유추할 수 있을 것이다.

한편, PDB 액체 배지에서 포르말린, 과산화수소의 수생균 억제력을 천연유황수 억제력과 비교한 결과, 50 ppm의 과산화수소수에서는 균사체의 성장이 전혀 관찰되지 않았다. 동일 농도의 포르말린에서는 균사체의 억제가 관찰되었고, 천연유황수의 경우 포르말린에 비해서는 조금 약하거나 동일한 수준의 균사체 억제 효과를 보였다 (Table 2). 포르말린은



50 ppm 이상에서 무지개송어에 감염된 *S. parasitica*에 대한 치료 효과가 보고되었는데, 이는 본 연구의 결과와도 일치하였다(Marking *et al.* 1994; Fitzpatrick *et al.* 1995; Mitchell and Collins, 1997; Bruno and Wood 1999; Gieseke *et al.* 2006). Willoughby (1994)에 따르면 과산화수소는 25 ppm에서 연어과 어류의 알에 감염된 수생균의 제어 효과가 있는 것으로 보고되어 본 연구의 결과와 2배 정도의 차이를 보였다. 그러나 과산화수소는 수질, 수온, 존재하는 *Saprolegnia* spp.의 수에 따라 효과가 달라지는 것으로 추정된다(Barnes *et al.* 1998).

**2. 천연유황수에 대한 미꾸라지의 안전성**

천연유황수 0, 25, 50, 100, 그리고 125 ppm에 대한 96시간의 급성 독성 시험 종료 후, 미꾸라지의 미성어와 치어의 대조군 및 천연유황수 100 ppm 이하에서는 폐사가 전혀 발생하지 않았다. 그러나 125 ppm 농도부터는 폐사가 발생하

였으며 250 ppm에서는 24일 이내에 모든 개체가 폐사하였다(Fig. 1). 미성어와 치어 모두 급성 독성 시험에서 최저영향농도 (LOEC)는 125 ppm으로 결정되었으나, 미성어의 반수치사농도(96hr-LC<sub>50</sub>)는 250 ppm, 치어에서 96hr-LC<sub>50</sub>는 125 ppm으로 결정되었다. 조직에 대한 독성 피해를 조사하기 위해 미성어 아가미, 간, 비장 표본의 병리조직학적 분석 결과, 100 ppm 이하에서는 각 장기에 대한 특별한 이상소견 및 병변이 관찰되지 않아 무영향농도(NOEC)로 결정되었다(Fig. 2). 이전에 수행한 독성 연구에서도 대조군과 100 ppm 농도에서 10마리의 잉어 치어에 대해 96시간, 30마리의 꿀벌에 대해 48시간 독성 시험을 수행한 결과, 100 ppm에서 1마리만이 비행 불능 상태를 보인 것을 제외하고 두 시험에 사용된 모든 개체에서 폐사와 이상행동은 관찰되지 않았다(Lee *et al.* 2013). SD Rat에 대한 급성경피독성 14day-LC<sub>50</sub> 값은 4,000 mg kg bw<sup>-1</sup> 이상으로서 농약관리법에 의거 독성구분 IV급(저독성, ≥4,000 mg kg<sup>-1</sup>)에 해당하였다(Lee *et al.* 2013).

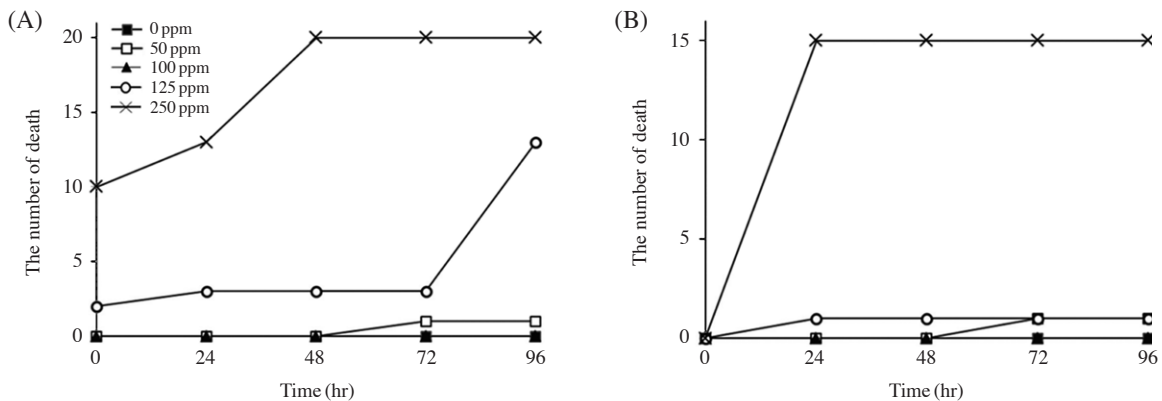
**3. 생태 독성 영향 측정**

천연유황수의 생태 독성을 알아보기 위한 예비 실험시 사용된 모든 시험농도(0, 10, 50, 100 ppm)에서 물벼룩의 유영 저해가 일어나지 않았다(Lee *et al.* 2016). 본시험은 예비 실험시 사용된 최대 농도인 100 ppm으로 수행되었는데, 시험기간 중 음성대조군 및 양성대조군인 약제 처리군에서 일반 중독증상 및 특이증상은 관찰되지 않았다. 시험 개시 48시간 경과 후 천연유황수 100 ppm에서 유영 저해 개체는 관찰되지 않았다. 따라서 반수영향농도(EC<sub>50</sub>) 및 95% 신뢰한계는 산출하지 않았다. 한편, 무영향관찰농도(NOEC)는 중독증상

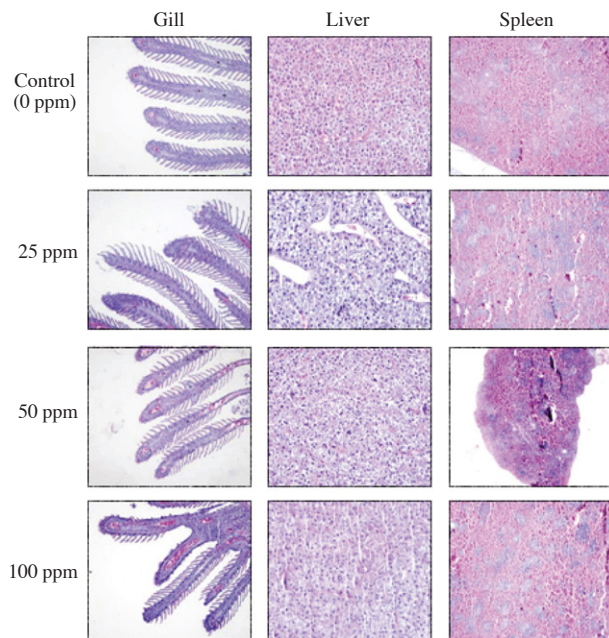
**Table 2.** Comparison of growth inhibition of *Saprolegnia parasitica* in PDB medium supplemented with sulfur solution processed by effective microorganisms (EM-PSS) and the other treatments. The growth of fungal hypha of *S. parasitica* were inhibited at the same concentrations (50 ppm) of formalin, hydrogen peroxide, and EM-PSS.

Treatment	Concentration (ppm)			
	0	10	30	50
Formalin	+*	+	+	-**
Hydrogen peroxide	+	+	+	-
EM-PSS	+	+	+	-

\*; + indicates the mycelial growth of *S. parasitica*  
 \*\*; - indicates no mycelial growth of *S. parasitica*



**Fig. 1.** Survival of mudfish (A) in juvenile stage and (B) in immature stage, for 96-hours acute toxicity experimental period. (A) Steady death of juvenile mudfish was observed at 125 and 250 ppm EM-PSS. Half the individuals died at 125 ppm within 96 hours, and the entire population died at 250 ppm within 48 hours. Based on the results, LOEC and LC<sub>50</sub> of EM-PSS were determined as 125 ppm for mudfish in juvenile stage. (B) Steady death of immature mudfish occurred only in 250 ppm of EM-PSS within 24 hours. Based on the results, LOEC and LC<sub>50</sub> of EM-PSS were determined as 125 and 250 ppm, respectively, for mudfish in immature stage.



**Fig. 2.** Pathological evaluation measured the acute toxicity of 0 (control), 25, 50, and 100-ppm EM-PSS, after 5 days post exposure. The gill, liver, and spleen of mud fish were stained with hematoxylin and eosin. There were no specific pathological findings in the rest organisms control and the rest experimental groups.

과 유영저해가 발생하지 않은 최고 시험 농도 이상(>100 ppm)으로 결정되었다. 즉, 시험 농도 내에서 100 ppm 이하의 농도에서는 생태 독성으로 인한 영향이 관찰되지 않았다.

## 적 요

말라카이트 그린과 메틸렌 블루 같은 기본 염료는 1930년 대부터 물 곰팡이 감염을 통제하는 소독제로 사용되었다. 하지만 이 염료의 발암성 및 생체 내부 축적이 보고된 후 공중 보건을 위해 이 염료의 사용이 금지되었다. 본 연구에서는 천연유황수의 *Saprolegnia parasitica*의 감염에 대한 치료 효과와 어류에서의 안전성을 평가하고자 하였다. 천연유황수의 항진균성 시험에서 *S. parasitica* 균사체의 성장이 50 ppm 또는 그 이상의 농도에서 억제되었다. 미꾸라지의 치어와 미성어에 대한 천연유황수의 급성 독성 시험에서 무 영향농도 (NOEC)는 100 ppm, 최저 영향농도 (LOEC)는 125 ppm 그리고 반수치사농도 (LC<sub>50</sub>)는 치어에서 125 ppm, 미성어에서 250 ppm으로 측정되었다. 또한, 물벼룩을 이용한 천연유황수의 생태 독성 시험에서는 100 ppm 이하의 농도에서 물벼룩의 유영저해가 나타나지 않았다. 결론적으로, 천연유황수

는 50 ppm 농도에서 미꾸라지에 대한 *S. parasitica*의 감염을 방지하였을 뿐만 아니라 100 ppm 농도까지 미꾸라지에 급성 독성 그리고 물벼룩에 생태독성을 나타내지 않았다. 그러므로 미꾸라지 양식에서 많은 문제를 일으키는 수생균을 제거하기 위하여 말라카이트 그린 및 메틸렌 블루 같은 발암성 소독제를 대신하여 천연유황수를 유용하게 사용할 수 있으며 잠재적으로 다른 어종 양식에서도 천연유황수를 친환경 소독제로 사용할 수 있을 것으로 기대된다.

## 사 사

이 논문은 2015년 해양수산부의 재원으로 한국해양과학기술진흥원의 수산실용화기술개발사업 (과제번호: 20150337)의 지원을 받아 수행된 연구임.

## REFERENCES

- Alderman DJ. 1985. Malachite green: a review. *J. Fish Dis.* 8:289-298.
- Barnes ME, DE Ewing, RJ Cordes and GL Young. 1998. Observations on hydrogen peroxide control of *Saprolegnia* spp. during rainbow trout egg incubation. *Prog. Fish. Cult.* 60:67-70.
- Bergwerff AA and P Scherpenisse. 2003. Determination of residues of malachite green in aquatic animals. *J. Chromatogr. B* 788:351-359.
- Block E. 1986. The art and science. pp. 125-137. In: *Folk Medicine* (Steiner RP ed.). American Chemical Society, Washinton DC, U.S.
- Block E. 1992. The organosulfur chemistry of the genus allium-Implications for the organic chemistry of sulfur. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 31:1135-1178.
- Choi KH and CH Kim. 2002. Growth inhibition of extract from sulfur fed duck carcass against various cancer cell lines. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* 22:348-351.
- Conti GO, C Copat, Z Wang, PD Agati, Cristaldi A and Ferrante M. 2015. Determination of illegal antimicrobials in aquaculture feed and fish: An ELISA study. *Food Control.* 50: 937-941.
- Diéguez-Uribeondo J, L Cerenius and K Söderhäll. 1994. *Saprolegnia parasitica* and its virulence on three different species of freshwater cryfish. *Aquaculture* 120:219-222.
- Ha YM, BB Lee, HJ Bae, KM Je, SR Kim, JS Choi and IS Choi. 2009. Anti-microbial activity of grapefruit seed extract and

- processed sulfur solution against human skin pathogens. *J. Life Sci.* 19:94-100.
- Han MS, KJ Cho, HK Nam, KK Kang, YE Na, MR Kim and MH Kim. 2013. Variation in population size of mudfish by agricultural practices in paddy fields. *Korean J. Environ. Agric.* 32:24-34.
- Hashimoto JC, JAR Paschoal, FF Queiroz and FGR Reyes. 2011. Considerations on the use of malachite green in aquaculture and analytical aspects of determining the residues in Fish: A review. *J. Aquat. Food Product. Technol.* 20:273-294.
- Jeon BY, DC Lee, NY Kim, SH Jung and SI Park. 2007. Identification and chemotherapeutic effects of the fungi from three salmonid species and their eggs. *J. Fish Pathol.* 20:147-160.
- Jung SJ and HY Kim. 2000. Process for purifying sulfur usable for Health care. Korea Patent 10-2000-0018316.
- Kim CH. 2002. Anticancer effect of extracts from sulfur fed duck carcass against various cancer cell lines. Korea Patent 10-2002-0051999.
- Kim HJ, JS Park, SY Kim, JG Koo, IC Bang and SR Kwon. 2013. Identification of water mold from wild brook lamprey, *Lethenteron reissneri*. *J. Fish Pathol.* 26:39-44.
- Kim HS and HK Lee. 1985. Studies on nutrient composition of loach; 2. Seasonal variations in heavy metal contents of loach in various area. *Korean J. Nutr.* 18:167-172.
- Kim SJ, KJ Kim, GY Kim, YK Kim, WS Kim, BK Son, JH Ahn, JY Yoo, BI Lee, YR Lee, GY Jeong, CH Jung, JC Choi, JB Choi and CO Choo. 2001. Minerals and Human Life. Kim SJ, ed. Taesung Publications, Seoul, Korea, 16.
- Korea Ministry of food and drug Safety. 2007. Notification No. 2007-84.
- Kumar M and JS Berwal. 1998. Sensitivity of food pathogens to garlic (*Allium sativum*). *J. Appl. Microbiol.* 84:213-215.
- Lee JS. 2005. Method of manufacturing process of food additives using eliminated noxious ingredient hydrargyrum and sulfur. Korea Patent 10-2005-0017093.
- Lee JY and KK Lee. 2014. Antimicrobial and Antioxidant Activity of *Allium hookeri* Root Extract and its Fractions. *Kor. J. Aesthet. Cosmetol.* 12:533-538.
- Lee SJ, MH Kim, SH Lee, HH Lee and DY Choi. 2013. Surfur removing poison produced using effective microorganism and uses thereof. Korea Patent 10-1334157-0000.
- Lee SJ, MH Kim, SH Lee, HH Lee, SB Chu, PS Seo, KH Kim. 2016. Manufacturing method and the usage of eco-friendly aquatic fungicidal agent composed of the water containing detoxified sulfur for use in fish. Korea Patent 10-1654253-0000.
- Min HK, NY Park and K Hatai. 1990. Experimental infection with *Saprolegnia diclina* type I in eels (*Anguilla japonica*). *J. Fish Pathol.* 3:61-67.
- Myung CS and YS Kang. 2005. The problem of using malachite green and what we can do about it. *J. Kor. Prof. Engineers Assoc.* 38:10-12.
- Olesen PT, JC Larsen and A Schnipper. 2007. Risk assessment of malachite green in food. National Food Institute, Technical University of Denmark.
- Park KW, GS Lee and SH Choi. 2012. Comparison of *in vitro* and *in vivo* anti-oxidant effects of loach muscle peptides. *Ann. Anim. Resour. Sci.* 23:112-118.
- Park SW and MJ Oh. 2011. Fungal Disease. pp. 371-372. In: *Pathology of Aquatic Life* (Park SW ed.). Bioscience Inc., Seoul, Korea.
- Pourreza N and S Elhami. 2007. Spectrophotometric determination of malachite green in fish farming water samples after cloud point extraction using nonionic surfactant Triton X-100. *Anal. Chem. Acta.* 596:62-65.
- Rushing LG and EB Hansen Jr. 1997. Confirmation of malachite green, gentian violet and their leuco analogs in catfish and trout tissue by high-performance liquid chromatography utilizing electrochemistry with ultraviolet-visible diode array detection and fluorescence detection. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 700:223-231.
- Seo BI. 2004. *Hebology*. Daegu Haneey University Press, Daegu, Korea. 491-492.
- Song IS, DH Youn and SY Hwa. 2007. Effect of oral administration of processed sulphur on hepatotoxicity. *Korean J. Orient. Physiol. Pathol.* 21:898-906.
- Srivastava S, R Sinha and D Roy. 2004. Toxicological effects of malachite green. *Aquat. Toxicol.* 66:319-329.
- Willoughby LG. 1994. *Fungi and Fish Diseases*. Willoughby LG, ed. Pisces Press, Stirling, Scotland, UK.
- Youn JL. 2000. Inhibitor contained sulfur for a lawn-disease. Korea Patent 10-2000-0075780.

Received: 26 April 2017

Revised: 9 May 2017

Revision accepted: 11 May 2017